

Dissertação: Artigo de Revisão Bibliográfica
Mestrado Integrado em Medicina
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da
Universidade do Porto

**BIOMARCADORES ÚTEIS PARA INFORMAR DOENTE E
MÉDICO NA ESCOLHA DA OPÇÃO MAIS ADEQUADA PARA
TRATAMENTO DO CANCRO DA PRÓSTATA**

Vitor Emanuel Leite Tavares

Orientador

Dr. José Manuel Queimada da Silva Soares

Porto 2016

Biomarcadores Úteis Para Informar Doente e Médico na Escolha da Opção Mais Adequada Para Tratamento do Cancro da Próstata

Dissertação de candidatura ao grau de mestre em Medicina,
submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, da
Universidade do Porto - Artigo de Revisão Bibliográfica

Autor: Vitor Emanuel Leite Tavares

Endereço: Rua da Cumieira, nº 64, Lordelo, União das juntas de freguesia de Vila Chã,
Codal e Vila Cova de Perrinho, 3730-404 Vale de Cambra

Categoria: Aluno do 6º Ano do Mestrado Integrado em Medicina

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto -
Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228, 4099-313 Porto, Portugal

Nº de Estudante: 200103970

Contacto Eletrónico: veltavares@gmail.com

Orientador: Dr. José Manuel Queimada da Silva Soares

Título Profissional: Assistente Hospitalar Graduado de Urologia - Hospital Santo
António - Centro Hospitalar do Porto - Largo do Prof. Abel Salazar, 4099-001 Porto,
Portugal

Grau Académico: Assistente Hospitalar Graduado de Urologia - Assistente Convidado
ICBAS

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto -
Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228, 4099-313 Porto, Portugal

Artigo escrito ao abrigo do novo acordo ortográfico.

Resumo

Introdução: o cancro da próstata ultrapassou o cancro do pulmão como o tipo de cancro mais comum em homens. A introdução do antígeno específico da próstata proporcionou um método para a deteção precoce e tem sido associado com uma diminuição da mortalidade, no entanto, também tem sido associado com um problema generalizado de excesso de diagnóstico e tratamento excessivo, com comprometimento da qualidade de vida e morbidade significativa. Um importante fator confundidor na escolha do tratamento é a dificuldade em caracterizar com precisão a natureza do cancro e o risco de metástases subsequentes ou morte pela doença não tratada. Assim, existe uma necessidade de novos biomarcadores que podem distinguir melhor os homens que são suscetíveis de desenvolver a doença agressiva. Identificação e incorporação desses biomarcadores na prática clínica tem o potencial para melhorar significativamente o tratamento do cancro da próstata.

Objetivos: analisar criticamente o estado atual da investigação em testes de biomarcadores selecionados para o tratamento do cancro da próstata, para informar os leitores sobre importantes aplicações clínicas atuais e futuras e suas limitações.

Métodos: o autor realizou uma pesquisa PubMed, de todos os artigos desde janeiro 2011 até abril 2016 utilizando as palavras-chave: *prostate, cancer, risk, stratification* e *biomarker*.

Conclusões: vários novos biomarcadores têm sido investigados ao longo dos últimos anos para discriminar cancro da próstata indolente de agressivo. O principal desafio para estes testes é a necessidade de provar a sua validade analítica e clínica, e utilidade clínica através de estudos prospetivos de maior dimensão. Não obstante, os biomarcadores descritos nesta revisão oferecem maneiras promissoras de caracterizar a agressividade biológica do cancro da próstata de forma diferente e melhor do que no passado. Uma melhor estratificação de risco irá encorajar a aceitação da vigilância ativa e ajudar a reduzir o excesso de tratamento.

Palavras-Chave: Cancro + Próstata + Biomarcador + Risco + Tratamento

Abstract

Introduction: prostate cancer surpassed lung cancer as the most common type of cancer in men. The introduction of prostate specific antigen provided a method for early detection and has been associated with a decreased mortality, however, it has also been associated with an overall excess diagnosis problem and excessive treatment, impairment of quality of life and significant morbidity. A major confounding factor in the choice of treatment is the difficulty to accurately characterize the nature of the cancer and the risk of subsequent metastasis or death for untreated disease. Thus, a need exists for new biomarkers that can better distinguish the men who are susceptible of developing aggressive disease. Identification and incorporation of these biomarkers in the clinic process has the potential to significantly improve the treatment of prostate cancer.

Objectives: To review the current state of research in selected biomarker tests for the treatment of prostate cancer to inform readers about important current and future clinical applications and limitations.

Methods: The author conducted a PubMed search of all articles from January 2011 to April 2016 using the keywords: prostate, cancer, risk, stratification and biomarker.

Conclusions: several new biomarkers have been investigated over the past years to discriminate indolent from aggressive prostate cancer. The main challenge for these tests is the need to prove their analytical and clinical validity, and also clinical utility through prospective studies of larger dimension. However, the biomarkers described in this review offer promising ways of characterizing the biological aggressiveness of prostate cancer differently and better than in the past. Better risk stratification will encourage acceptance of active surveillance and help reduce over-treatment.

Keywords: Prostate + Cancer + Biomarker + Risk + Treatment

Agradecimentos

Ao Dr. José Manuel Queimada da Silva Soares, pela sua disponibilidade em ser o meu orientador, pela ajuda na escolha deste tema e pela sua cooperação na elaboração e revisão científica deste trabalho.

Aos meus pais, por me terem proporcionado esta oportunidade e acima de tudo pelo apoio incondicional ao longo destes anos de curso, por sempre terem acreditado em mim, principalmente quando eu por vezes não acreditava.

Ao meu irmão e cunhada, pela ajuda sempre que precisei e pelos constantes incentivos e felicitações quando superava mais uma etapa, deram-me o alento para aqui chegar.

À minha família por nunca terem duvidado que ia conseguir este objetivo.

Aos meus companheiros de faculdade e de curso, por juntos termos superado todas as adversidades e por fazerem destes últimos anos os melhores da minha vida.

Índice

| | |
|--|------------|
| Resumo | ii |
| Abstract | iii |
| Agradecimentos..... | iv |
| Lista de Abreviaturas | vi |
| Introdução | 1 |
| Objetivos | 2 |
| Métodos..... | 2 |
| Biomarcadores e critérios para a sua adoção clínica | 3 |
| Biomarcadores úteis para distinguir tumores agressivos de indolentes | 3 |
| <i>OncotypeDx® Prostate Cancer Assay.....</i> | <i>3</i> |
| <i>Prolaris® cell cycle progression score.....</i> | <i>5</i> |
| <i>Decipher® Genomic Classifier</i> | <i>8</i> |
| <i>Promark™</i> | <i>12</i> |
| Biomarcadores úteis para avaliar a resposta terapêutica em CaP metastático resistente à castração | 15 |
| AR-V7 | 15 |
| Células Tumorais Circulantes..... | 17 |
| Conclusões | 18 |
| Referências Bibliográficas | 20 |

Lista de Abreviaturas

AUC – *Area Under Curve*

BPAP – Biópsia Por Agulha da Próstata

CaP – Cancro da Próstata

CaPmRC - Cancro da Próstata metastático Resistente a Castração

CAPRA-S - *Cancer of the Prostate Risk Assessment Score*

CCP-S – *Cell Cycle Progression Score*

CTCs – Células Tumorais Circulantes

FEP – Fixa Embebida em Parafina

FFEP – Fixo em Formaldeído Embebido em Parafina

GC - *Genomic Classifier*

GPS – *Genomic Prostate Score*

GS – *Gleason Score*

HR – *Hazard Ratio*

NCCN - *National Comprehensive Cancer Network*

OR – *Odds Ratio*

PR – Prostatectomia Radical

PSA – Antígeno Específico da Próstata

RECIST - *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*

ROC - *Receiver Operator Characteristic*

RBQ – Recorrência Bioquímica

RT – Radioterapia

RTUP – Ressecção Transuretral da Próstata

VA – Vigilância Ativa

VPP – Valor Preditivo Positivo

Introdução

O cancro da próstata (CaP) ultrapassou o cancro do pulmão como o tipo de cancro mais comum em homens. É geralmente aceite que estas alterações resultaram do rastreio com antígeno específico da próstata (PSA) que detetou muitos CaP em estadio inicial. Estima-se que 233.000 novos casos foram diagnosticados em 2014, respondendo por 27% dos novos casos de cancro em homens. Felizmente, as taxas de mortalidade ajustadas por idade por CaP diminuíram (menos 4,1% anualmente de 1994 a 2001). Os investigadores estimam que o cancro da próstata foi responsável por 29.480 mortes em 2014. Esta taxa de mortalidade comparativamente baixa sugere que a menos que o cancro da próstata se esteja a tornar biologicamente menos agressivo, o aumento da sensibilização da opinião pública com a deteção e tratamento precoce começou a afetar a mortalidade por este cancro prevalente ^[1].

A introdução do PSA tem proporcionado um método para a deteção precoce de CaP e tem sido associado com uma diminuição da mortalidade por CaP. No entanto, também tem sido associado com um problema generalizado de excesso de diagnóstico e tratamento excessivo do CaP não agressivo ^[2]. Uma abordagem personalizada, incluindo a previsão de resultados individuais para os doentes e respostas terapêuticas, é importante em todos os tipos de cancro, mas especialmente para o CaP, dada a variabilidade de comportamento da doença, a diversidade de opções de tratamento, e o risco de perda da qualidade de vida relacionada com o tratamento ^[3]. Alguns doentes terão doença altamente agressiva que pode metastisar cedo e revelar-se fatal. A maioria dos doentes terão tumores de crescimento lento relativamente inofensivos que não ameaçam a sua saúde durante o tempo de vida e podem ser adequadamente tratados com vigilância ativa (VA) ou tratamento local ^[4]. Enquanto os homens com CaP agressivo beneficiam de tratamento, os doentes com CaP indolente podem sofrer com os efeitos colaterais do tratamento, com comprometimento da qualidade de vida e morbilidade significativa (incluindo disfunção erétil e incontinência urinária) sem benefício potencial a longo prazo ^[5].

Atualmente um importante fator confundidor na escolha do tratamento para homens com CaP é a dificuldade em caracterizar com precisão a natureza do cancro e o risco de metástases subsequentes ou morte pela doença não tratada. Os fatores de risco estabelecidos no momento do diagnóstico são estadio clínico, os níveis de PSA em circulação, o *Gleason score* (GS) e extensão do cancro em uma amostra de biopsia ^[6]. A atribuição de risco usando valores categóricos (por exemplo, PSA 10-20 ng/ml) e

critérios de fator único (a categoria de "alto risco" inclui, por exemplo, os homens com cancro GS 8-10, independentemente do estadio clínico ou o nível de PSA), com cada fator com igual ponderação, cria grupos heterogêneos; homens com perspectivas marcadamente diferentes são classificados juntos em um único grupo de prognóstico, como por exemplo "risco intermédio". Alguns homens neste grupo têm um prognóstico pobre e um alto risco de recorrência, mesmo com terapia definitiva cedo, mas outros podem ter um cancro relativamente indolente e poderiam seguramente ser observados em um programa de VA ^[7].

Devido a isso, em comparação com os padrões de diagnóstico utilizados em outros cancros, a avaliação da agressividade do cancro da próstata ainda é arcaica ^[2]. Assim, existe uma necessidade de novos biomarcadores que podem distinguir melhor os homens que estão propensos a ter CaP e particularmente os homens que são suscetíveis de desenvolver a doença agressiva. Identificação e incorporação desses biomarcadores na prática clínica tem o potencial para melhorar significativamente o tratamento do CaP ^[8].

Objetivos

O objetivo desta revisão é analisar criticamente o estado atual da investigação em testes de biomarcadores selecionados para o tratamento (estadiamento, prognóstico e monitoramento) do CaP, para informar os leitores sobre importantes aplicações clínicas atuais e futuras e suas limitações.

Métodos

O autor realizou uma pesquisa PubMed, de todos os artigos desde o início até abril 2016 utilizando as palavras-chave: *prostate cancer + Risk stratification + biomarker*. Da busca resultaram 394 artigos. Foram selecionados os artigos publicados desde 2011, obtendo-se 221 artigos. Destes excluíram-se 166 artigos com base no título e leitura do resumo por não se enquadrarem no tema desta revisão, nomeadamente artigos cujo âmbito eram biomarcadores para rastreio e diagnóstico de CaP. Aos 55 artigos resultantes foram adicionadas 19 referências obtidas dos 55 artigos consultados.

Biomarcadores e critérios para a sua adoção clínica

O *Biomarkers Definitions Working Group* definiu biomarcadores como sendo: uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas para uma intervenção terapêutica. Dentro destes, marcadores tumorais são indicadores substitutos que aumentam ou diminuem a suspeita do médico que os futuros eventos clinicamente importantes, como o aparecimento de cancro, recidiva, progressão ou morte do doente, vão ou não vão acontecer, e/ou que um tratamento específico irá diminuir o risco de tais eventos ^[9].

Diagnósticos moleculares podem incluir biomarcadores como ácidos nucleicos (RNA ou DNA), proteínas, e metabolitos, os quais podem ser medidos numa variedade de amostras humanas (por exemplo, tecido, plasma ou urina). Ensaio à base de ácido nucleico podem incluir a medição da expressão de genes em RNA mensageiro, a deteção de anormalidades genéticas, tais como deleções, mutações de genes, e fusões de genes, e marcadores epigenéticos, tais como a metilação do DNA ^[10].

A adoção clínica de biomarcadores exige que eles sejam analiticamente validados para fornecer resultados robustos e com boa reprodutibilidade, serem validados para prever resultados clinicamente relevantes e oferecerem um desempenho equivalente através de um espectro da doença, incluindo raça e idade (utilidade clínica) ^[11].

Biomarcadores úteis para distinguir tumores agressivos de indolentes

OncotypeDx[®] Prostate Cancer Assay (GPS)

O *OncotypeDx[®] Prostate Cancer Assay* é um teste de expressão de múltiplos genes com base em uma *real-time polymerase chain reaction* desenvolvido pela *Genomic Health[®]*. O teste mede a expressão de 17 genes usando aproximadamente, 1 mm de amostras de biópsia por agulha da próstata (BPAP) fixa embebida em parafina (FEP) ^[12].

Os genes selecionados foram desenvolvidos a partir de um grupo inicial de 732 genes candidatos testados em 441 amostras de prostatectomia radical (PR) pela sua capacidade de prever a recorrência clínica local ou distante após a cirurgia. Eles foram depois refinados em uma *cohort* separada de amostras de BPAP pré-operatória (N=167) para prever patologia adversa na amostra de PR subsequente. O nível de expressão

destes 17 genes é usado para gerar um *Genomic Prostate Score* (GPS) que varia de 0 a 100, com pontuações mais altas a indicar doença mais agressiva ^[13].

Entre estes 17 genes, 12 são relacionados com cancro, representando resposta estromal, sinalização de andrógenos, organização celular e proliferação. Os restantes cinco genes são constitutivos. Os estudos de validação analítica demonstraram que todos os genes no teste preencheram os critérios pré especificados para precisão e reprodutibilidade, utilizando apenas 5 ng de RNA ^[12].

No primeiro estudo de validação clínica, a população final foi composta por 395 doentes submetidos a PR com uma mistura de riscos desde baixo a baixo-intermédio, 31% dos quais tinham doença de alto grau ou não confinada ao órgão após PR. O desfecho primário pré-especificado foi a capacidade do GPS para prever grau e estadió após prostatectomia, ajustado para GS na biópsia. Em análises multivariadas separadas e ajustadas para co-variáveis clínicas significativas [*Cancer of the Prostate Risk Assessment Score* (CAPRA-S) ^[13], critérios de risco da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) ^[14], ou, tomadas em conjunto, idade, PSA, estadió clínico, e GS na biópsia] GPS foi um preditor consistente de patologia de alto grau e/ou patologia não confinada ao órgão. O estudo também concluiu que a combinação de CAPRA-S e GPS produziu maior benefício do que a informação clínica sozinha. Assim, é expectável que o uso do GPS leve a menos tratamentos em doentes que têm patologia favorável após prostatectomia sem aumentar o número de doentes com patologia adversa deixados sem tratamento ^[15].

OncotypeDx[®] foi posteriormente validado como um teste genético baseado em amostras de BPAP para prever patologia adversa (distinguindo entre doença clinicamente indolente e agressiva) em uma *cohort* etnicamente diversificada de 402 homens tratados para CaP de risco NCCN muito baixo, baixo ou baixo-intermédio, entre 1990 e 2011 em dois centros médicos dos EUA, incluindo uma alta proporção de homens africo-americanos. Em análises univariadas e multivariadas o GPS foi fortemente associado com o tempo para metástase e patologia adversa (incluindo doença de alto grau e não confinada ao órgão) nas amostras de PR. Este estudo concluiu também que o GPS era uma medida consistente de agressividade do CaP independente dos parâmetros clínicos e patológicos, incluindo etnia ^[16].

Até ao momento, mais dois estudos foram publicados avaliando o impacto do *OncotypeDX*[®] na prática clínica. Klein et al. relatou a validação em 608 doentes submetidos a BPAP que tiveram a patologia final avaliados (grau e estadió) por PR ^[17].

Assim, eles foram capazes de descrever o impacto do OncotypeDX® na previsão de patologia adversa em PR. Cullen et al. utilizou um cenário semelhante e analisou as biópsias de 431 doentes com CaP com critérios de risco da NCCN semelhantes. Eles confirmaram os bons resultados apresentados por Klein et al. para prever patologia adversa em PR [18].

O *OncotypeDX*® parece ser uma ferramenta clínica reprodutível, validada analiticamente e clinicamente para avaliar a agressividade do CaP nas amostras de BPAP, e pode adicionar informações importantes quando os doentes estão a fazer a escolha crítica entre VA e terapia definitiva. Os dados publicados, no entanto, são limitados, e a precisão do exame em prever metástases ou morte por cancro necessita de ser fundamentada em *cohorts* maiores. O relatório de validação clínica [15] afirma a capacidade do GPS "para discriminar a agressividade do CaP, apesar da heterogeneidade do tumor, multifocalidade e amostragem limitada no tecido de biópsia." Mas os dados apresentados não são convincentes, devido a estudos anteriores que documentam a heterogeneidade molecular do CaP e o erro de amostragem inerente a BPAP [19,20].

Prolaris® cell cycle progression score (CCP-S)

Prolaris® é um teste de diagnóstico que foi desenvolvido pela *Myriad*®. Este teste baseia-se na avaliação da expressão de 31 genes de progressão do ciclo celular e 15 genes controladores. Foi projetado para avaliar doentes com CaP de baixo risco que podem ser candidatos para VA, bem como doentes que têm alto risco de metástase e que possam beneficiar de um acompanhamento mais próximo ou terapia adicional após tratamento curativo [4].

O teste é baseado na determinação e combinação dos níveis de expressão de 31 genes de progressão do ciclo celular e 15 genes controladores em amostras BPAP FEP ou amostras de PR [21]. Tem sido demonstrado que a expressão de genes de progressão do ciclo celular varia entre diferentes tipos de células e reflete o padrão de mitose [22]. As células cancerígenas, especialmente as células cancerígenas agressivas, vão transcrever mais genes de progressão do ciclo celular que as células normais, devido à proliferação contínua. Assim, a expressão de genes de progressão do ciclo celular poderia refletir a biologia do tumor, o que pode ser útil para prever os prognósticos em cancros. Este facto foi demonstrado em outros tipos de neoplasias [23,24].

Um *cell cycle progression score* (CCP-S) foi calculado a partir da média de expressão destes genes. Para CaP intermédio o CCP-S foi de 0, variando de -3,0 a +7,0, com uma mudança de uma unidade representando aproximadamente uma duplicação da expressão do gene ^[21]. O ensaio comercial tem uma validade analítica alta: resultados reproduzíveis foram obtidos a partir de ensaios em triplicado em 97-99% das amostras de BPAP FEP com pelo menos 0,5 mm de cancro. ^[25, 26].

O CCP-S foi analisado em amostras de BPAP do *Transatlantic Prostate Group of conservatively managed patients*. De 349 homens analisáveis, o CCP-S médio foi de 1,03 (intervalo interquartil 0,41-1,74). A incidência cumulativa de morte foi maior entre aqueles com CCP-S superior a 2 (19% da população). A incidência cumulativa de morte foi semelhante entre os homens em categorias de pontuação mais baixa (CCP-S de 1-2, 0-1, ou 0). Em análise multivariada, o *hazard ratio* (HR) de morte por CaP foi de 1,7 por aumento de unidade no CCP-S. Poucos doentes com GS 6 tiveram CCP-S de 2 ou mais, e ele não foi preditivo em homens com GS 6 ^[25].

O CCP-S foi depois testado em mais duas *cohorts*, uma representada por 366 homens tratados com PR entre 1985-1995 identificados através do registo de tumores na *Scott and White Clinic*, a outra composta por 337 homens diagnosticados com CaP clinicamente localizado na ressecção transuretral da próstata (RTUP) entre 1990 e 1996, que tinham menos de 76 anos no momento do diagnóstico, tinham uma medição de PSA de base, e não receberam terapia hormonal. O CCP-S mostrou ser um forte prognosticador de recorrência bioquímica (RBQ) e morte, após a progressão da doença na *cohort* após PR, assim como de morte na *cohort* após RTUP, independente de vários parâmetros clínicos, incluindo GS, estadio e PSA na *cohort* após PR, e GS, PSA e a extensão do cancro na *cohort* após RTUP ^[21].

Cooperberg et al. validaram externamente os resultados iniciais da *cohort* após PR, em um grupo independente de 413 doentes e confirmaram a capacidade do CCP-S de prever RBQ após PR. Além disso, eles descobriram que, a combinação do CCP-S e do CAPRA-S melhorou o índice de concordância tanto para a *cohort* total como para um subconjunto de baixo risco ^[27]. Freedland et al. demonstraram o valor do CCP-S para prever o resultado em doentes tratados com radioterapia (RT) primária ^[28].

Em todos estes estudos o CCP-S acrescentou precisão ao prognóstico dado pelas características clínicas padrão, tais como GS e PSA, bem como a uma combinação de fatores clínico-patológicos preditivos (incluindo idade, estadio clínico e extensão do cancro na biópsia) na previsão do tempo para o desfecho primário, com um HR de

aproximadamente 2 (intervalo 1,7-2,6) por unidade de mudança no CCP-S. O CCP-S correlaciona-se de forma fraca, mas significativa com GS ($r=0,21-0,61$) e PSA ($r=0,14-0,27$), apoiando a premissa de que mede uma característica biológica importante do cancro não captada por características clínico-patológicas [27].

No entanto, a aplicação mais imediata do CCP-S é para homens com CaP em estadio inicial de risco baixo a intermédio, quando confrontados com a difícil escolha entre VA e terapia definitiva imediata. Vários estudos têm abordado a utilidade clínica do CCP-S neste cenário. Em uma grande *cohort* de homens tratados de forma conservadora, Cuzick et al. avaliou o CCP-S em 585 homens diagnosticados por BPAP e seguidos por uma média de 9,6 anos. O CCP-S era prognóstico independente de mortalidade específica por CaP aos 10 anos (HR de 1,8 na análise multivariada). De 80 homens diagnosticados com cancro de baixo risco por critérios clínicos (mortalidade específica por CaP aos 10 anos inferior a 4,3% em homens tratados de forma conservadora), 19 (24%) foram identificadas como tendo maior risco pelo CCP-S, enquanto que 31 (6%) de 505 homens com cancro de risco intermédio e alto risco foram classificados como de baixo risco pelo CCP-S e, portanto, bons candidatos para VA. Não foram relatadas mortes por CaP em 10 anos naqueles com um CCP-S baixo. Quando o CCP-S foi combinado com critérios clínicos em um grande conjunto de homens cujas amostras foram submetidas ao teste ($N=1.718$), 29% seriam elegíveis para VA por critérios clínicos, mas 55% seriam elegíveis quando o CCP-S foi adicionado aos critérios clínicos [29].

Para analisar a forma como os médicos utilizam o *Prolaris*®, a *Myriad*® patrocinou uma pesquisa com médicos que relataram as suas recomendações para o tratamento de 305 doentes com base em dados clínicos pré-teste, e novamente após o CCP-S estar disponível. Em 94 dos 305 doentes (31%), a recomendação dos médicos foi alterada: em 33 doentes (11%) de VA para intervenção (PR, radioterapia ou terapia sistémica) e o inverso, de intervenção para VA em 61 doentes (20%). A maior mudança ocorreu quando um CCP-S elevado foi relatado em homens com cancro de baixo risco clínico, ou quando um CCP-S baixo foi relatado em homens com cancro de risco intermédio [30]. Embora tenha alterado estratégias de tratamento na maioria dos casos, este estudo não respondeu à questão se foi uma decisão "certa" mudar e que ramificações aconteceram com a mudança em comparação com um grupo similar, quando o teste não foi usado.

Num outro conjunto de 4.261 doentes avaliados por CCP-S e critérios clínicos, foi identificado um cancro mais agressivo (do que por critérios clínico-patológicos) em 37%

dos doentes e um cancro menos agressivo em 21%. A maioria dos cancros, no entanto, teve apenas uma mudança de uma unidade no CCP-S, apenas 6,5% eram consideravelmente menos (2,5%) ou mais (4%) agressivos (uma mudança de duas ou mais unidades de CCP score) [25].

Uma recente revisão e meta-análise resume as evidências sobre o valor que o CCP-S tem em elucidar o potencial agressivo de CaP em um doente individual e como os resultados do teste podem influenciar decisões de tratamento clínico [31]. Quando o teste é realizado em tecido de biópsia, pode ajudar a estratificar doentes de risco intermédio (segundo os critérios da *American Urology Association/D'Amico* [32]) em doentes de risco menos agressivo que podem ser tratados de forma conservadora com VA e em doentes de risco mais agressivo que podem beneficiar de tratamento definitivo precoce, além de ajudar a determinar o risco de mortalidade específica por CaP a 10 anos do doente. Quando é executada em tecido de PR, ajuda a determinar o risco pós-operatório de RBQ a 10 anos e se o tratamento pós-operatório é indicado [27].

Em resumo, o CCP-S é uma nova e promissora ferramenta para estratificar melhor os doentes com CaP. Uma das limitações desta ferramenta é o uso de RBQ como um desfecho primário na maioria dos estudos. O significado da previsão deste desfecho primário para um doente individual pode diferir significativamente. Um doente com uma recorrência precoce de PSA (dentro de 1 ano após a PR) com um tempo de duplicação do PSA curto (abaixo de 3 meses), obviamente, tem maior risco para a progressão e a maioria dos uro-oncologistas vai concordar que este doente beneficia de tratamento adicional. Mas um outro doente com uma recorrência de PSA sete anos após PR com um tempo de duplicação de PSA de 18 meses tem um prognóstico completamente diferente, e o tratamento pode ser efetivamente iniciado aquando da recorrência evitando os efeitos secundários do tratamento de longo prazo. O CCP-S devia se concentrar em desfechos clínicos mais adversos. Infelizmente, apenas dois estudos relataram desfechos primários de sobrevivência. Mais estudos clínicos prospetivos são necessários no futuro para provar este teste como um biomarcador prognóstico e uma ferramenta para orientar o tratamento [4].

Decipher® Genomic Classifier (GC)

Decipher® Genomic Classifier (GC) é um teste genético pós-operatório do transcriptoma (conjunto completo de transcritos: RNAs mensageiros, RNAs ribossómicos, RNAs transportadores e os microRNAs) desenvolvido pela *GenomeDx Biosciences®* e *Mayo Clinic®*. O teste utiliza amostras de CaP fixo em formaldeído e

embebido em parafina (FFEP), e foi desenvolvido e validado como um preditor específico de metástases e mortalidade específica por CaP após PR, em homens com características patológicas adversas, conforme definido por GS alto, extensão extra prostática, invasão da vesícula seminal, ou positividade do nódulo linfático [33,34].

Este teste baseia-se na expressão de RNA de 22 genes envolvidos na adesão celular, migração, motilidade tumoral, modulação do sistema imunitário, controlo do ciclo celular, e 3 genes com função não codificante ou desconhecida [4,5]. Os genes incluídos no modelo final foram selecionados como sendo aqueles que melhor refletiram o desenvolvimento de metástases num conjunto de 359 doentes através de um teste de todo o transcriptoma. O GC relata uma pontuação de variável contínua entre 0 e 1, com uma pontuação mais elevada a refletir um risco maior de metástases. Para a extração do RNA, áreas de cancro foram microdissectadas a partir de três ou quatro seções de 10 micron da área de lesão de maior grau na amostra de PR FFEP. Amostras adequadas de RNA foram obtidas a partir de 76% a 92% de amostras clínicas, e a validade analítica do GC foi estabelecida em mais de 1.500 amostras de doentes [15,33,35,36].

O primeiro estudo de validade clínica do GC foi desenvolvido a partir da análise de mais de um milhão de RNAs em 545 doentes que fizeram PR para CaP como tratamento de primeira linha no *Mayo Clinic Comprehensive Cancer Center* entre 1987 e 2001, incluindo 192 casos (doentes com doença metastática em período de acompanhamento) e 353 controles (doentes sem qualquer evidência de doença ou RBQ no período de acompanhamento). O GC foi comparado contra um classificador com base na clínica, que incluía o GS patológico, PSA pré-operatório, margens cirúrgicas positivas, extensão extra prostática, invasão da vesícula seminal, ou positividade do nódulo linfático e um GC e clínico combinado. Os 545 doentes foram divididos posteriormente em um grupo de treino (N=359) e validação (N=186). Os resultados mostraram que, tanto no grupo de treino como no grupo de validação, GC e GC e clínico combinado tiveram a maior *area under curve* (AUC) na curva *receiver operator characteristic* (ROC) para prever casos (grupo treino: 0,90 e 0,91; grupo validação: 0,75 e 0,74, respetivamente). O classificador clínico teve apenas uma AUC de 0,69 no grupo de validação, que foi apenas marginalmente melhor do que o GS patológico sozinho (0,65). Quando dicotomizado em grupos com GC de risco baixo ($\leq 0,5$) e alto ($> 0,5$), a *odds ratio* (OR) para prever os casos era de 6,79 (IC 95%: 3,46-13,29), mais de duas vezes o do GS que era de 3,02 (IC 95%: 1,61-5,68). Em análise multivariada, após

ajuste para tratamento pós-PR, o GC permaneceu como a única variável prognóstica significativa ($P < 0,001$). Comparando pontuações do GC com GS nas amostras de PR, pontuações altas do GC foram encontradas em 29% dos cancros GS 7, e na maioria dos cancros GS 8-10, mas em nenhum dos cancros $GS \leq 6$. Na análise multivariada, o GC era o único preditor independente do tempo para metástases (OR de 1,4 para cada aumento de 10% no GC). Os autores concluíram que o GC adiciona informações independentes e significativas para a previsão de metástases precoces após aumento do PSA, que não são capturadas pelas variáveis clínicas disponíveis a partir da análise patológica. [33].

Em um estudo de validação com uma *cohort* separada, foi feito um estudo caso-controle com 256 homens (73 com metástases). RNA foi extraído a partir de 92% dos doentes, 6% dos quais desenvolveram metástases no espaço de cinco anos. O GC foi o preditor mais preciso de metástases (AUC de 0,79, HR de 1,51 para cada aumento de 10%), e foi ainda mais preciso quando combinado com variáveis clínico-patológicas (AUC de 0,82). Em geral, o GC sozinho ou em combinação com um nomograma que incluía todas as variáveis clínico patológicas atualmente aceites, era capaz de estratificar o grupo de estudo em doentes com baixo risco (2,4%) de metástases em cinco anos (60% da *cohort*), dos que estão em risco intermédio (6%), que têm um risco semelhante ao grupo como um todo (20% da *cohort*) e daqueles em risco elevado (22,5%). Apesar do desempenho notável do GC neste estudo, a população do estudo foi enriquecida substancialmente com doentes que desenvolveram metástases. Antes do aparecimento de metástases foi administrada terapia adjuvante com radiação ou terapia hormonal a 45% dos doentes e terapia de resgate (após RBQ) a 70% [35]. Uma vez que a terapia adicional após PR aumenta substancialmente o tempo para o aparecimento de metástases, mas pode não alterar a sobrevivência a longo prazo [37,38], o GC pode revelar-se menos preciso quando usado para prever o tempo de metástases em estudos prospetivos com amostras representativas de todos os homens tratados com a cirurgia.

Após estes dois estudos iniciais, foram estudados 169 homens que foram submetidos a PR na *Cleveland Clinic*, entre 1987 e 2008, que cumpriam os seguintes critérios: patologia adversa na PR (PSA pré-operatório superior a 20 ng/mL, estadio pT3 ou margem positiva, ou $GS \geq 8$), após PR apresentavam nódulo patológico negativo e PSA indetetável e que não receberam terapia neoadjuvante ou adjuvante. Quinze desenvolveram metástases no espaço de 5 anos; dos 154 sem metástases em cinco

anos, 34 desenvolveram metástases mais tarde. O GC foi a variável mais importante para prever metástase precoce e, quando combinado com modelos de risco clínicos amplamente utilizados, tais como o CAPRA-S e o nomograma Stephenson^[39], produziu o maior benefício em modelos de análise de decisão. O GC foi capaz de identificar um subgrupo de homens com risco elevado de metástase precoce e morte por CaP (50% dentro de sete anos), cujos cancros apresentavam características clínico-patológicas semelhantes a doentes com muito menor risco de morrer da doença (25% no prazo de 15 anos). A vantagem clínica do GC, em comparação com outros modelos de risco, foi ser capaz de identificar mais precisamente doentes com baixo risco de metástases, apesar de características clínico-patológicas de alto risco, que poderiam ser poupados de terapia adicional^[17].

Num outro estudo, o GC foi capaz de discriminar os doentes com RBQ, ajudando a distinguir aqueles que vão ou não progredir para metástases clínicas, superando modelos clínicos isolados, como o CAPRA-S e o nomograma de Stephenson, apresentando maior benefício através de uma ampla gama de riscos. Tal como é o caso com as características patológicas dos tumores da próstata após PR, as características moleculares que definem estes tumores podem aumentar a predição de agressividade da doença no momento de RBQ e ajudar a orientar a decisão de efetuar tratamento de resgate, evitando o sobre tratamento^[40].

Em outro estudo o GC melhorou significativamente a AUC do nomograma de Stephenson na previsão de falha bioquímica e metástases à distância em 139 homens que receberam RT pós-PR. Além disso, o estudo constatou que, para doentes com GC baixo (GC inferior a 0,4, tal como definido neste estudo) os resultados não foram diferentes em homens que receberam terapia adjuvante ou RT de resgate; para homens com GC intermédio ou alto (maior que 0,4) o momento da iniciação da RT em termos de níveis de PSA, alterou significativamente a sobrevivência após falha bioquímica e metástases à distância. Os autores concluíram que o grupo de doentes com GC alto é uma população de doentes em quem a intensificação da terapêutica seria justificado^[41].

Têm sido realizados diversos estudos para investigar o impacto do GC sobre a toma de decisão de tratamento adjuvante/resgate em doentes com CaP de alto risco, e estes mostraram que os urologistas são suscetíveis de alterar as decisões de tratamento quando confrontados com informações de biomarcadores após a PR, em comparação com confiar apenas na informação clínica^[42-44]. Num desses estudos foram apresentados casos clínicos representativos de homens com CaP de alto risco, e os

médicos foram questionados se recomendariam terapia adjuvante. Foram então apresentados aos mesmos médicos a pontuação do GC para esses doentes e pediu-se novamente as suas recomendações. Para 31% dos doentes, a recomendação dos médicos foi alterada, na maioria das vezes de tratamento para VA. Com o conhecimento da pontuação do GC, os médicos recomendaram tratamento em apenas 19% dos doentes com pontuações de baixo risco e em 65% daqueles com pontuações de alto risco. O tratamento foi adiado quando a pontuação GC previu um risco de metástases inferior a 7%, mas foi recomendado quando o risco foi maior ^[43].

Em resumo, este teste é uma nova ferramenta promissora para estratificar doentes com CaP após PR. Uma vantagem deste teste é o facto de que ele foi testado e validado para prever metástases e mortalidade por CaP após PR. Em estudos retrospectivos, o teste foi informativo em mais de 90% das amostras de tecido de PR e foi capaz de classificar os doentes como tendo baixo (0-2,4%) ou alto (24-50%) risco de metástases dentro de cinco anos após a cirurgia ^[6]. Embora o GC não esteja validado em todo o espectro de doentes tratados com PR, ele parece ser um indicador preciso, mas devido ao também elevado nível de precisão dos preditores clínicos ^[45], pode revelar-se mais valioso em doentes de risco intermédio. Não é claro como os resultados deste teste devem ser utilizados para orientar o tratamento de um doente individual, mas parece existir um componente preditivo para o tempo mais adequado para e quem deve receber RT pós-operatória. Ensaios clínicos prospetivos são necessários para comprovar o valor deste teste promissor, e não só devem avaliar resultados oncológicos, mas também a qualidade de vida do doente e os recursos dos cuidados de saúde ^[4].

ProMark™

ProMark™ é um teste prognóstico desenvolvido pela Metamark Genetics™ que utiliza imunofluorescência para medir os níveis de oito biomarcadores proteicos no epitélio do tumor, identificados em secções intactas de amostras de BPAP FFEP e que preveem a agressividade do tumor ^[46].

No estudo original, começando com um grande grupo de potenciais candidatos, foram identificados 12 biomarcadores que previram agressividade patológica e mortalidade, mesmo sob circunstâncias de grande variabilidade nas amostras, um problema tipicamente encontrado durante a obtenção de BPAP. Usando um grande grupo (N=380) de amostras de prostatectomia com longo período de seguimento, as áreas de maior e menor GS em cada tecido da próstata foram biopsadas para gerar emparelhamentos “altos” e “baixos”, simulando assim biópsias com erro de amostragem

para cada doente. Usando estes emparelhamentos “altos” e “baixos”, foram avaliados um grande número de candidatos a biomarcadores pela capacidade de prever CaP agressivo e mortalidade, quando medidos tanto em regiões de cancro de baixo ou alto grau em cada doente. [47].

O teste foi depois refinado para os oito biomarcadores proteicos atuais em um estudo cego de 381 biópsias de doentes com amostras de prostatectomia correspondentes (“estudo de desenvolvimento”). A fim de desenvolver um teste robusto, várias instituições foram recrutadas representando *cohorts* de doentes norte-americanos típicos: *Urology Austin, Chesapeake Urology Associates, Cleveland Clinic, Michigan Urology, and Folio Biosciences*. Os critérios de inclusão/exclusão de amostras de biópsia corresponderam com aqueles que seriam utilizados durante o uso clínico do teste. Uma vez que eles geralmente não são candidatos para a VA, doentes com biópsia $GS \geq 4+3$ foram excluídos, com exceção de um número limitado de biópsias ($N=28$) que foram discordantemente classificadas como 3+4 e 4+3 por dois patologistas experientes. O objetivo do “estudo de desenvolvimento” foi definir um modelo de biomarcadores capaz de distinguir entre patologia da próstata geralmente recomendada para VA [“GS 6”: GS cirúrgico 3+3 e patologia localizada ($\leq T3a$)] e aquela mais propensa a exigir prostatectomia [“não-GS 6”: GS cirúrgico $\geq 3+4$ ou patologia não localizada ($> T3a$ ou N ou M)] [46]. Esta definição “GS 6” contra “não-GS 6” foi baseada em estudos que mostram que os tumores com GS cirúrgico 3+3 em amostras de prostatectomia não metastatizam [45].

Foi definida uma pontuação *ProMark*[™] resultante, um número contínuo entre 0 e 1, que estimou a probabilidade de patologia “não-GS 6”. As análises de sensibilidade identificaram um conjunto ideal de 8 biomarcadores com o melhor desempenho em distinguir casos “GS 6” de casos “não-GS 6” e confirmaram a robustez do desempenho. O conjunto de biomarcadores com o mais alto desempenho teve um teste de AUC de 0,79 (intervalo de confiança (IC) de 95%, 0,72-0,84). Dado que muitos conjuntos de biomarcadores tiveram desempenho semelhante no teste AUC, tanto o desempenho univariável como a frequência de ocorrência nos modelos com a melhor performance foram utilizados para escolher o conjunto de biomarcadores final para validação. [46].

Este estudo foi depois estendido num estudo de validação clínica, que foi conduzido para validar o desempenho do conjunto de 8 biomarcadores em prever patologia da próstata por conta própria e em relação a sistemas de classificação de risco dos doentes (NCCN e D'Amico). Este estudo utilizou amostras de biópsia de um grupo de doentes

independente da utilizada para o “estudo de desenvolvimento”, e gerou uma pontuação *ProMark*[™] para cada amostra. A *cohort* do estudo de validação (N=276) foi composta por biópsias de doentes com amostras de prostatectomia correspondentes, tratados na *University of Montreal Hospital Center*. Os critérios de inclusão foram biópsias com um GS 3+3 ou 3+4 (foram incluídas 17 biópsias com classificações discordantes de 3+4 e 4+3 por dois patologistas experientes), e amostra de prostatectomia correspondentes com o estadiamento TNM patológico, nível de PSA, e o GS cirúrgico que daí resultava. Para categorização final dos doentes durante o estudo de validação foram escolhidos dois conjuntos de desfechos primários. Ao conjunto de desfechos primários utilizados no estudo de desenvolvimento ("GS 6" e "não-GS 6") foi adicionado um segundo conjunto: patologia "favorável" contra "não favorável". Patologia “favorável” foi definida como GS cirúrgico $\leq 3+4$ e doença confinada ao órgão ($\leq T2$) enquanto patologia "não favorável" foi definida como GS cirúrgico $\geq 4+3$ ou doença não confinada ao órgão (T3a, T3b, N+ ou M+) [46]. Este desfecho final reflete a crescente consciência de que a doença confinada ao órgão e com padrão de Gleason não dominante de valor 4 provavelmente manter-se-á indolente e terá um significativo melhor prognóstico a longo prazo do que Gleason padrão dominante de valor 4 ou doença não confinado ao órgão [48]. A análise para a patologia "favorável" produziu uma AUC de 0,68 com IC de 95% de 0,61-0,74. A patologia "GS 6" produziu uma AUC de 0,65 com IC de 95% de 0,58-0,72. [46].

Foram comparados os resultados da pontuação *ProMark*[™] com as atuais categorias de classificação de risco, conforme definido pela NCCN e D'Amico, usando valores preditivos positivos (VPP). Especificamente, o estudo mostrou que, com uma pontuação *ProMark*[™] inferior a 0.33, este teste pode identificar doentes com patologia favorável nos grupos de risco NCCN muito baixo e baixo e de risco D'Amico baixo, com VPP de 95%, 81,5 %, e 87,2%, respetivamente, o que representa uma melhoria significativa sobre os sistemas de estratificação de risco NCCN ou D'Amico sozinhos. As informações fornecidas pelo teste para além dos parâmetros patológicos existentes podem ajudar tanto o médico como o doente a considerar VA com mais confiança. Além disso, o teste também foi capaz de identificar doentes com patologia não-favorável que são impróprios para VA. Enquanto um doente com uma pontuação *ProMark*[™] maior que 0,8 tem um VPP de 76,9% para a patologia não-favorável, o VPP chega a 100%, se a pontuação *ProMark*[™] é maior que 0,9 em todos os grupos de risco para ambos os sistemas de estratificação testados. Este estudo mostra como este biomarcador pode ser usado em combinação com os sistemas de estratificação atuais para personalizar o

nível de risco para cada doente individual, permitindo uma decisão racional e baseada em evidência para o médico e o doente ^[46].

A principal vantagem do *ProMark*[™] é a sua capacidade para avaliar alterações moleculares no tecido intacto, analisando alterações especificamente no interior do epitélio do tumor. Contudo, embora as proteínas selecionadas tivessem sido escolhidas pela sua capacidade de prever o risco de patologia agressiva em análises de lesões de baixo e alto grau dentro da mesma próstata, este teste pode não superar totalmente o erro de amostra da biópsia, porque cancros de baixo grau com localização remota de uma lesão de alto grau podem ter um perfil molecular diferente de cancros imediatamente adjacentes ^[49,50]. Além disso, os comparadores clínicos utilizados para avaliar as informações adicionais fornecidas pelo *ProMark*[™] não incluem alguns dos modelos preditivos mais rigorosos como CAPRA-S, ou nomogramas que abrangem todos os parâmetros clínico-patológicos estabelecidos. Finalmente, o desfecho final escolhido demonstra a agressividade do tumor, mas não prevê totalmente os resultados clínicos a longo prazo ^[6].

Biomarcadores úteis para avaliar a resposta terapêutica em CaP metastático resistente à castração

Aproximadamente 45% dos doentes com CaP metastático resistente à castração (CaPmRC) são refratários ao tratamento, e em respondedores, a progressão do tumor pode ocorrer após uma média de 6-8 meses. Apesar do PSA ser útil como um biomarcador de resposta ao tratamento e evolução da doença nos estadios iniciais de CaP, esta proteína tem mostrado ser pouco fiável em relação ao CaPmRC. Uma avaliação rápida e confiável da resposta ao tratamento é fundamental para a orientação otimizada e personalizada do tratamento do (CaPmRC) e para isso são urgentemente necessários biomarcadores de prognóstico mais sensíveis que podem predizer quais as terapias que vão ser eficazes e quais não vão em doentes com CaPmRC ^[51].

AR-V7

É aceite atualmente que o CaPmRC não é independente de androgénios e continua a precisar da sua sinalização ^[52]. Devido a este novo entendimento, surgiram recentemente fármacos como a enzalutamida e abiraterona para o tratamento do CaPmRC. Estes agentes suprimem a síntese de androgénios extragonadais ou têm como alvo direto o recetor de androgénios (RA) ^[53]. Embora enzalutamida e abiraterona

representem avanços no tratamento do CaPmRC, aproximadamente 20 a 40% dos doentes não têm resposta a estes agentes quando relacionados com PSA (isto é, têm resistência primária) [54,55]. Uma explicação plausível para a resistência a ambos os agentes envolve a presença de variantes de *splicing* do RA [56,57].

Um marcador que tem recebido muita atenção é uma variante de *splicing* do RA chamado AR-V7. Um estudo prospetivo demonstrou que o RNA mensageiro da AR-V7 pode ser detetada de modo fiável a partir de células tumorais circulantes (CTCs) e que a sua deteção em células de tumor parece estar associada com resistência a enzalutamida e abiraterona. Este modelo conceptualmente simples é biologicamente plausível, porque a proteína codificada pelo AR-V7 não possui o domínio de ligação ao ligando do RA (o alvo direto de enzalutamida e o alvo indireto de abiraterona) mantendo-se constitutivamente ativa como um fator de transcrição de uma forma ligando-independente. Se estas conclusões forem apoiadas por outros estudos, é possível que o AR-V7 possa ser utilizado como um biomarcador para prever a resistência à enzalutamida e abiraterona e para facilitar a seleção de tratamento. No entanto, o estudo não prova uma relação causal entre o AR-V7 e a resistência à enzalutamida ou abiraterona, e continua a ser possível que o AR-V7 seja unicamente um marcador de doença mais avançada [58].

Um estudo preliminar posterior apresentado na *Genitourinary Cancers Symposium* 2015 demonstrou que a presença de RNA mensageiro do AR-V7 nas CTCs de doentes com CaPmRC em vias de iniciar quimioterapia era compatível com a sensibilidade a taxanos (docetaxel ou cabazitaxel). Os investigadores demonstraram que os homens AR-V7 positivos tiveram uma probabilidade significativamente maior de progressão clínica e radiológica quando tratados com enzalutamida ou abiraterona em comparação com os homens AR-V7 positivos tratados com taxanos. Se um doente era AR-V7 positivo, as probabilidades de progressão quando tratados com taxanos eram aproximadamente 79% mais baixas do que aqueles que receberam terapia dirigida aos RA. Por outro lado, houve um aumento de 4,8 vezes do risco de progressão para os doentes AR-V7 positivos que recebem enzalutamida ou abiraterona. Em contraste, não pareceu existir uma diferença na sobrevida livre de progressão em homens AR-V7 negativos tratados com terapias dirigidas aos RA ou terapia com taxanos. Concluíram então que em homens AR-V7-positivos, é possível que os taxanos possam ser mais eficazes do que as terapias dirigidas ao RA, ao passo que em homens AR-V7 negativos, os taxanos parecem ter uma eficácia comparável. O biomarcador AR-V7 tem potencial

para ser utilizado na ajuda à seleção de tratamento em homens com CaPmRC nomeadamente a escolha entre a terapia com taxanos e a dirigida ao RA^[59]. Atualmente, não há nenhum teste padronizado ou disponível comercialmente para a identificação de AR-V7.

Células Tumorais Circulantes (CTCs)

As CTCs são células cancerígenas que foram libertadas a partir de depósitos de tumor primário ou metastático e entraram para o sangue periférico^[60,61]. Estudos têm demonstrado que as CTCs são geneticamente representativas do depósito do tumor principal e, portanto, podem servir como uma fonte facilmente acessível das células tumorais para diversas análises^[62,63].

Foi demonstrado que a análise de CTCs tem um valor prognóstico e preditivo em CaPmRC^[64-68]. Num estudo de 231 homens com CaPmRC, números altos de CTCs (≥ 5 células por 7,5 mL) antes da terapia foram associadas com uma sobrevida média mais curta do que números baixos. Além disso a conversão de um número alto (≥ 5) em baixo (< 5) com o tratamento foi associada com maior sobrevida^[65]. Um estudo de follow-up da mesma *cohort* de doentes com CaPmRC analisou apenas os doentes que receberam a terapia de primeira linha e mostrou que o número absoluto de CTCs e a conversão no número de CTCs foram prognósticas para a sobrevivência neste grupo^[69]. Posteriormente, Scher et al, analisou o número de CTCs como um desfecho primário intermédio válido para a sobrevida global em um estudo de fase III prospetivo de tratamento com abiraterona em CaPmRC refratário a docetaxel e relatou que a conversão do número de CTCs (de ≥ 5 para < 5 células por 7,5 ml) em resposta ao tratamento foi reflexiva e proporcional ao efeito do tratamento na sobrevida global^[70]. Da mesma forma, num cenário de CaP metastático sensível a hormonas, o número de CTCs previu a duração e magnitude da resposta à terapia de privação de androgénios^[68].

Mais recentemente Goldkorn et al, conduziram um estudo de fase III randomizado, duplamente cego para o tratamento de primeira linha com docetaxel com ou sem atrasentan em homens com CaPmRC. Eles concluíram que um número de CTCs de cinco ou mais por 7,5 mL estava associada com maior carga tumoral e com pior evolução da doença, tal como pior dor óssea, maior PSA, mais doenças do fígado, hemoglobina inferior e maior fosfatase alcalina. Um número de CTCs de cinco ou mais por 7,5 mL também foi associada com pior resposta do PSA e pior *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* (RECIST)^[71] além de pior sobrevida global e separação

marcada nas curvas de sobrevida de Kaplan-Meier, daqueles com número de CTCs menor que cinco. Este estudo foi a primeira validação prospetiva do número de CTCs como um marcador de prognóstico no contexto de tratamento de primeira linha com docetaxel [72].

Posteriormente Thalgott et al, detetaram CTCs em 122 amostras de doentes com CaPmRC submetidos a quimioterapia com docetaxel no início do estudo e após 1, 4 e 10 ciclos e compararam o valor prognóstico do número de CTCs pós-tratamento e a resposta objetiva para previsão de sobrevivência. A resposta objetiva foi avaliada pela resposta morfológica RECIST e critérios clínicos após 4 e 10 ciclos. Os autores relataram que o número de CTCs e a resposta clínica revelaram um importante valor prognóstico para a sobrevida global, enquanto os critérios RECIST não tiveram significância. Os dados sugerem que o número de CTCs deve ser incorporado na orientação de diagnóstico e tratamento, como um parâmetro de prognóstico mais precoce e sensível da sobrevivência global em comparação com a resposta objetiva [73].

Detetar CTCs e extrair informação molecular é atualmente um trabalho laborioso e caro, e ainda é incerto até que ponto a abundância de CTCs no sangue representa doença agressiva com disseminação hematogénica ou simplesmente são células que se desalojaram do tumor principal. Novas tecnologias de deteção de CTCs, que permitam um isolamento altamente sensível e análises moleculares detalhadas posteriores, têm um grande potencial no monitoramento em tempo real e não invasivo das doenças. A aplicação clínica de CTCs no futuro poderá envolver um dispositivo que fornece o número de CTCs de forma rápida e confiável, executa a sua caracterização molecular, e dessa forma auxilia na decisão terapêutica. Contudo, grandes estudos de validação são necessários para esclarecer a relevância clínica de tais abordagens [74].

Conclusões

O CaP é uma doença clínica e molecularmente heterogénea. Discriminar os doentes com baixo risco de progressão de doentes com cancro da próstata letal é obrigatório para melhorar a sobrevivência e evitar excesso de tratamento de forma a aumentar a qualidade de vida. Vários novos biomarcadores têm sido investigados ao longo dos últimos anos para discriminar CaP indolente de agressivo, e para avaliar a resposta terapêutica em CaP avançado de forma a auxiliar na toma de decisão terapêutica de médicos e doentes.

Apesar da maioria ter progredido para o desenvolvimento comercial (e um deles, Prolaris®, ter sido aprovado pela *Food and Drug Administration*), o principal desafio para estes testes é a necessidade de provar a sua validade analítica e clínica, e utilidade clínica através de estudos prospetivos de maior dimensão e também de estudos comparando diferentes biomarcadores para avaliar o seu real valor na gestão do CaP. Além disso a avaliação clínica de risco de CaP localizado é atualmente bastante precisa. Em estudos relatados, a proporção de homens cuja categoria de risco clínico é substancialmente alterada pelo resultado do biomarcador é relativamente pequena. O desafio para estes novos biomarcadores, portanto, é demonstrar que são capazes de fornecer uma estratificação de risco mais precisa do que a alcançada com as melhores ferramentas clínicas e modelos preditivos atuais, ou resultados semelhantes sem a necessidade de exames mais caros e/ou invasivos. Outra das limitações que apresentam, deve-se ao facto de não existirem até ao momento estudos de custo-benefício, que justifiquem a sua inclusão nas práticas clínicas atuais. Por fim, a paisagem de biomarcadores para CaP está continuamente em evolução, de tal forma que alguns dos biomarcadores emergentes atuais podem cair em desuso no futuro, enquanto que novos podem ser tornados disponíveis para uso clínico.

Não obstante, os biomarcadores descritos nesta revisão oferecem maneiras promissoras de caracterizar a agressividade biológica do CaP e avaliar a resposta terapêutica em CaP avançado de forma diferente e melhor do que no passado. Estes novos testes tendem a se tornar amplamente utilizados e a ser cada vez mais valiosos na prática clínica, em parte devido à sua reprodutibilidade que fornece uma maior garantia relativamente às variações na atribuição de GS pelos patologistas e das interpretações de exames de imagem entre os radiologistas. Além disso a decisão para VA ou terapia definitiva é tão importante e tão carregada de efeitos potenciais sobre a qualidade de vida, que os médicos e os doentes vão continuar a procurar biomarcadores para ajudá-los a tomar melhores decisões médicas. Uma melhor estratificação de risco irá encorajar a aceitação da VA, ajudar a reduzir o excesso de tratamento e permitir o monitoramento menos rigoroso de doentes em VA, reduzindo a necessidade de biópsias frequentes. Medicina personalizada ou de precisão é uma meta para o século XXI. Por isso o desenvolvimento de biomarcadores é um campo excitante e em rápido desenvolvimento que promete melhorar o atendimento e os resultados clínicos dos doentes.

Referências Bibliográficas

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. (2014) Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*; 64:9-29.
2. Rong Na, Yishuo Wu, Qiang Ding, Jianfeng Xu. (2016) Clinically available RNA profiling tests of prostate tumors: utility and comparison. *Asian Journal of Andrology*; 18, 1–5.
3. Sanda MG, Dunn RL, Michalski J, et al. (2008) Quality of life and satisfaction with outcome among prostate-cancer survivors. *N Engl J Med*; 358:1250–61.
4. Martin Spahn, Silvan Boxler, Steven Joniau, Marco Moschini, Bertrand Tombal, Jeffrey Karnes. (2015) What is the Need for Prostatic Biomarkers in Prostate Cancer Management? *Curr Urol Rep* 16: 70.
5. S. M. Falzarano, M. Ferro, E. Bollito, E. A. Klein, G. Carrieri, C. Magi-Galuzzi. (2015) Novel biomarkers and genomic tests in prostate cancer: a critical analysis. *Minerva Urol Nefrol*; 67:211-31.
6. Itay A. Sternberg, Ian Vela and Peter T. Scardino. (2016) Molecular Profiles of Prostate Cancer: To Treat or Not to Treat. *Annu. Rev. Med.* 67:119–35.
7. Klotz L, Vesprini D, Sethukavalan P, et al. (2015) Long-term follow-up of a large active surveillance cohort of patients with prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 33:272–77.
8. Brian T. Helfand, MD, PhD, William J. Catalona, MD and Jianfeng Xu, MD, Dr. Ph. (2015) A Genetic-Based Approach to Personalized Prostate Cancer Screening and Treatment. *Curr Opin Urol*. January; 25(1): 53–58.
9. Sturgeon CM, Duffy MJ et al. (2008) National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem.* 54:e11-e79.
10. Steven E. Canfield, MD, Adam S. Kibel, MD, Michael J. Kemeter, MSPAS, Phillip G. Febbo, MD, H. Jeffrey Lawrence, MD, Judd W. Moul, MD. (2014) A Guide for Clinicians in the Evaluation of Emerging Molecular Diagnostics for Newly Diagnosed Prostate Cancer. *Rev Urol*;16(4):172-180.
11. Febbo PG, Ladanyi M, Aldape KD, et al. (2011) NCCN task force report: evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* ;9(Suppl 5): S1–32.

12. Knezevic D, Goddard AD, Natraj N, et al. (2013) Analytical validation of the Oncotype DX prostate cancer assay - a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. *BMC Genomics*; 14:690.
13. Cooperberg MR, Broering JM, Carroll PR. (2009) Risk assessment for prostate cancer metastasis and mortality at the time of diagnosis. *J Natl Cancer Inst*; 101:878–87.
14. NCCN clinical practice guidelines in oncology (NCCN Guidelines). (2013) Prostate cancer, version 2.2013. National Comprehensive Cancer Network Web site:http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#prostate.
15. Klein EA, Cooperberg MR, Magi-Galluzzi C, Simko JP, Falzarano SM, Maddala Teta! (2014) A 17-gene assay to predict prostate cancer aggressiveness in the context of Gleason grade heterogeneity, tumor multifocality, and biopsy undersampling. *Eur Urol*; 66:550-60.
16. Cullen J, Rosner IL, Brand TC, Zhang N, Tsiatis AC, Moncur J et al. (2014) A Biopsy-based 17-gene Genomic Prostate Score Predicts Recurrence After Radical Prostatectomy and Adverse Surgical Pathology in a Racially Diverse Population of Men with Clinically Low- and Intermediate-risk Prostate Cancer. *Eur Urol*; pii: S0302-2838(14)01213-5.
17. Klein EA, Yousefi K, Haddad Z, Choeurng V, Buerki C, Stephenson AJ, et al. (2015) A genomic classifier improves prediction of metastatic disease within 5 years after surgery in node-negative high-risk prostate cancer patients managed by radical prostatectomy without adjuvant therapy. *Eur Urol*; 67:778–86.
18. Cullen J, Rosner IL, Brand TC, Zhang N, Tsiatis AC, et al. (2015) A Biopsy-based 17-gene genomic prostate score predicts recurrence after radical prostatectomy and adverse surgical pathology in a racially diverse population of men with clinically low- and intermediate-risk prostate cancer. *Eur Urol*; 68: 123–31.
19. Dinh KT, Mahal BA, Ziehr DR, et al. (2015) Incidence and predictors of upgrading and upstaging among 10,000 contemporary patients with low-risk prostate cancer. *J. Urol.* 194:343–49.
20. Fraser M, Berlin A, Bristow RG, et al. (2015) Genomic, pathological, and clinical heterogeneity as drivers of personalized medicine in prostate cancer. *Urol. Oncol.* 33:85–94.
21. Cuzick J, Swanson GP, Fisher G, Brothman AR, Berney DM, Reid JE et al. (2011) Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle

- proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol*; 12:245-55.
22. Mosley JD, Keri RA. (2008) Cell cycle correlated genes dictate the prognostic power of breast cancer gene lists. *BMC Med Genomics*; 1: 11.
 23. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, et al. (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*; 347: 1999–2009.
 24. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, et al. (2005) Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*; 365: 671–9.
 25. Cuzick J, Berney DM, Fisher G, et al. (2012) Prognostic value of a cell cycle progression signature for prostate cancer death in a conservatively managed needle biopsy cohort. *Br. J. Cancer*. 106:1095–99
 26. Crawford ED, Shore N, Scardino PT, et al. (2015) Performance of CCP assay in an updated series of biopsy samples obtained from commercial testing. Presented at Genitourinary Cancers Symp. (GU ASCO), Feb. 26–28, Orlando, FL.
 27. Cooperberg MR, Simko JP, Cowan JE, et al. (2013) Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. *J Clin Oncol*; 31:1428–34.
 28. Freedland SJ, Gerber L, Reid J, et al. (2013) Prognostic utility of cell cycle progression score in men with prostate cancer after primary external beam radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 86:848–53.
 29. Cuzick J, Stone S, Fisher G, et al. (2015) Validation of an RNA cell cycle progression (CCP) score for predicting prostate cancer death in a conservatively managed needle biopsy cohort. *Br. J. Cancer*. 113:382–89.
 30. Crawford ED, Scholz MC, Kar AJ, Fegan JE, Haregewoin A, Kaldate RR, et al. (2014) Cell cycle progression score and treatment decisions in prostate cancer: results from an ongoing registry. *Curr Med Res Opin*; 30:1025–31.
 31. Sommariva S, Tarricone R, Lazzeri M, Ricciardi W, Montorsi F. (2014) Prognostic value of the cell cycle progression score in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol*; pii: S0302-2838(14)01221-4.
 32. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. (1998) Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*; 280:969–74.

33. Erho N, Crisan A, Vergara IA, Mitra AP, Ghadessi M, Buerki C et al. (2013) Discovery and validation of a prostate cancer genomic classifier that predicts early metastasis following radical prostatectomy. *PLoS One*. 8:e66855.
34. Klein EA, Yousefi K, Haddad Z, Choeurng V, Buerki C, Stephenson AJ et al. (2015) A genomic classifier improves prediction of metastatic disease within 5 years after surgery in node-negative high-risk prostate cancer patients managed by radical prostatectomy without adjuvant therapy. *Eur Urol*; 67:778-86.
35. Karnes RJ, Bergstralh EJ, Davicioni E, et al. (2013) Validation of a genomic classifier that predicts metastasis following radical prostatectomy in an at risk population. *J. Urol*. 190:2047–53.
36. Cooperberg MR, Davicioni E, Crisan A, et al. (2015) Combined value of validated clinical and genomic risk stratification tools for predicting prostate cancer mortality in a high-risk prostatectomy cohort. *Eur. Urol*. 67:326–33.
37. Bolla M, van Popel H, Tombal B, et al. (2012) Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy for high-risk prostate cancer: long-term results of a randomised controlled trial (EORTC trial 2291). *Lancet*. 830:2018–27.
38. Abrahamsson P-A, Anderson J, Boccon-Gibod L, et al. (2005) Risks and benefits of hormonal manipulation as monotherapy or adjuvant treatment in localized prostate cancer. *Eur. Urol*. 48:900–5.
39. Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, et al. (2005) Postoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J. Clin. Oncol*. 23:7005–12.
40. Ross AE, Feng FY, Ghadessi M, Erho N, Crisan A, Buerki C et al. (2014) A genomic classifier predicting metastatic disease progression in men with biochemical recurrence after prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis*; 17:64-9.
41. Den RB, Feng FY, Showalter TN, Mishra MV, Trabulsi EJ, Lallas CD et al. (2014) Genomic prostate cancer classifier predicts biochemical failure and metastases in patients after postoperative radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 89:1038-46.
42. Badani K, Thompson DJ, Buerki C, Davicioni E, Garrison J, Ghadessi M et al. (2013) Impact of a genomic classifier of metastatic risk on postoperative treatment recommendations for prostate cancer patients: Vol. 67 - No. 3 FALZARANO a report from the DECIDE study group. *Oncotarget*; 4:600-9.

43. Badani KK, Thompson DJ, Brown G, Holmes D, Kella N, Albala D et al. (2015) Effect of a genomic classifier test on clinical practice decisions for patients with high-risk prostate cancer after surgery. *BJU Int*; 115:419-29.
44. Michalopoulos SN, Kella N, Payne R, Yohannes P, Singh A, Hettinger C et al. (2014) Influence of a genomic classifier on post-operative treatment decisions in high-risk prostate cancer patients: results from the PRO-ACT study. *Curr Med Res Opin*; 30:1547-56.
45. Eggener SE, Scardino PT, Walsh PC, et al. (2011) Predicting 15-year prostate cancer specific mortality after radical prostatectomy. *J. Urol.* 185:869–75.
46. Blume-Jensen P, Berman DM, Rimm DL, Shipitsin M, Putzi M, Nifong TP et al. (2015) Development and Clinical Validation of an In Situ Biopsy-Based Multimarker Assay for Risk Stratification in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*.
47. Shipitsin M, Small C, Choudhury S, Giladi E, Friedlander S, Nardone J et al. (2014) Identification of proteomic biomarkers predicting prostate cancer aggressiveness and lethality despite biopsy-sampling error. *Br J Cancer*; 111:1201-12.
48. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. (2013) Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU international*; 111:753-60.
49. Roychowdhury S, Chinnaiyan M. (2013) Advancing precision medicine for prostate cancer through genomics. *J. Clin. Oncol.* 31:1866–73.
50. Fraser M, Berlin A, Bristow RG, et al. (2015) Genomic, pathological, and clinical heterogeneity as drivers of personalized medicine in prostate cancer. *Urol. Oncol.* 33:85–94.
51. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T et al. (2014) EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*; 65:467-79.
52. Longo DL. (2010) New therapies for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*; 363:479-81.
53. Ryan CJ, Tindall DJ. (2011) Androgen receptor rediscovered: the new biology and targeting the androgen receptor therapeutically. *J Clin Oncol*; 29:3651-8.
54. Scher HI, Fizazi K, Saad F, et al. (2012) Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med*; 367:1187-97.
55. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, et al. (2011) Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*; 364:1995-2005.

56. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ. (2008) Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res*; 68:5469-77.
57. Hu R, Dunn TA, Wei S, et al. (2009) Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*; 69:16-22.
58. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC et al. (2014) AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*; 371:1028-38.
59. Antonarakis ES, Lu C, Chen Y, Luber B, Wang H, Nakazawa M et al. (2015) AR splice variant 7 (AR-V7) and response to taxanes in men with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). in 2015 Genitourinary Cancers Symposium. Orlando, Florida.
60. Pantel, K., Alix-Panabieres, C. & Riethdorf, S. (2009) Cancer micrometastases. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 339–351.
61. Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S. & Haber, D. A. (2011) Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J. Cell. Biol.* 192, 373–382.
62. Fehm, T. et al. (2002) Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin. Cancer Res.* 8, 2073–2084.
63. Heitzer, E. et al. (2013) Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res.* 73, 2965–2975.
64. Danila DC, Fleisher M, Scher HI. (2011) Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 17:3903-3912.
65. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. (2008) Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14:6302-6309.
66. Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, et al. (2007) Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13:2023-2029.
67. Danila DC, Heller G, Gignac GA, et al. (2007) Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13: 7053-7058.

68. Goodman OB Jr, Symanowski JT, Loudyi A, et al. (2011) Circulating tumor cells as a predictive biomarker in patients with hormone-sensitive prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 9:31-38.
69. Scher HI, Jia X, de Bono JS, et al. (2009) Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: A reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol* 10:233-239.
70. Scher HI, Heller G, Molina A, et al. (2011) Evaluation of circulating tumor cell (CTC) enumeration as an efficacy response biomarker of overall survival (OS) in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC): Planned final analysis (FA) of COU-AA301, a randomized double-blind, placebo-controlled phase III study of abiraterone acetate (AA) plus low-dose prednisone (P) post docetaxel. *J Clin Oncol* 29:293s. (suppl; abstr LBA4517).
71. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R et al. (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*; 45:228-47.
72. Goldkorn A, Ely B, Quinn DI, Tangen CM, Fink LM, Xu T et al. (2014) Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*; 32:1136-42.
73. Thalgott M, Heck MM, Eiber M, Souvatzoglou M, Hatzichristodoulou G, Kehl Vetai. (2015) Circulating tumor cells versus objective response assessment predicting survival in metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with docetaxel chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*.
74. Miyamoto DT, Sequist LV, Lee RJ. (2014) Circulating tumour cells-monitoring treatment response in prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol*; 11:401-12.